ет, что при диплостомозе рыба контаминирована микроорганизмами Сем. Enterobacteriaceae и рода Pseudomonas.

Однако при постодиплостомозе такие виды промысолвых рыб как густера, плотва, карась, сазан и толстолобик имеют более высокий уровень обсемененности микрофлорой Сем. Enterobacteriaceae, рода Pseudomonas (Pseudomonas aeruginosa), рода Staphylococcus, относящихся к возбудителям токсикоинфекций.

Резюме: В статье приведены результаты изучения бактериальной обсемененности промысловых рыб при диплостомозе и постодиплостомозе в условиях Цимлянского водохранилища Волгоградской области.

SUMMARY

There are described the results of studying of bacterial semination of marketable fish in diplostomose and postodiplostomose under conditions of Tsimlyansky reservoir of Volgograd region.

Keywords: diseases of fishes, diplostomose, postodiplostomose, bacteriological semination of marketable fish.

Литература

1. Васильков, Г.В. Гельминтозы рыб / Г.В. Васильков. - М.: Колос, 2003. - 208 с.
2. Грищенко, Л.И. Болезни рыб и основы рыбоводства / Л.И. Грищенко. - М.: Колос, 1999 .-278 с.
3. Федоткина, С.Н. Паразитофауна рыб в естественных и искусственных водоемах Волгоградской области/ С.Н. Федоткина, А.Н. Шинкаренко//Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса.- Волгоград, 2007.-№4.-С. 98-100.
4. Беретарь И.М. Паразитофауна белого толстолобика в прудовых хозяйствах Краснодарского края. – Краснодар. – Ветеринария Кубани, № 5, 2009. – с. 10-11.

Контактная информации об авторах для переписки

Дубинин Александр Валерьевич, аспирант, ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный аграрный университет», г. Волгоград, пр. Университетский, д. 24а, (8442)411619 (раб), e.mail: Dubinin134@mail.ru

Шинкаренко Александр Николаевич, доктор ветеринарных наук, заведующий кафедрой инфекционной патологии и судебной ветеринарной медицины, ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный аграрный университет», г. Волгоград, пр. Университетский, д. 24а, (8442)411619 (раб), e.mail: ash28@yandex.ru

УДК 619 : 616.98 : 578.824.91 : 636.22 /.28 : 616-078

Константинова Е.А., Диев В.И.

(Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»))

РАЗРАБОТКА НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЭФЕМЕРНОЙ ЛИХОРАДКИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые слова: вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, иммуноферментный анализ

Введение

Эфемерная лихорадка (ЭЛ) (трехдневная лихорадка, эпизоотическая лихорадка) – острая вирусная трансмиссивная болезнь крупного рогатого скота (КРС), характеризуется кратковременной лихорадкой, воспалением слизистой оболочки глаз, носовой и ротовой полостей, а в тяжелых случаях - параличами и хромотой, снижением лактации [6, 7, 8]. Встречается в тропических и субтропических зонах, в том числе в сопредельных с Россией госу-

дарствах, поэтому не исключена опасность возникновения этого заболевания на территории нашей страны. В связи с этим необходимо иметь высокоэффективные методы диагностики, которые позволили бы идентифицировать возбудителя ЭЛ или определить наличие антител в крови КРС с целью ретроспективной диагностики заболевания.

В России для серологической диагностики ЭЛ КРС используются реакция нейтрализации (РН), реакция диффузионной преципитации (РДП), реакция длительного связывания комплемента (РДСК), а метод постановки иммуноферментного анализа (ИФА) не разработан [4, 5, 6]. Поэтому в дальнейшем были проведены исследования по определению оптимальных условий постановки непрямого варианта ИФА (нИФА) для определения уровня антител в крови крупного рогатого скота, экспериментально зараженного вирусом эфемерной лихорадки КРС.

Материалы и методы

Реакцию длительного связывания комплемента (РДСК) ставили по утвержденной ранее методике.

Антиген. В работе использовали очищенный и концентрированный культуральный антиген вируса эфемерной лихорадки штамм «ВНИИЗЖ-М»[2].

Сыворотки. Положительным контролем служила гипериммунная к ВЭЛ сыворотка крови КРС, а в качестве отрицательного - сыворотка крови КРС, не содержащая антител к данному вирусу.

Контролями специфичности сыворотки крови служили гетерологичные иммунные сыворотки крови КРС против вирусов бешенства, ящура и чумы КРС.

В работе были использованы также сыворотки крови, полученные до заражения и через 7, 14, 21, 28, 35 и 42 день после заражения КРС вирусом эфемерной лихорадки [4].

Конъюгат. Использовали коммерческий антибычий конъюгат, меченый пероксидазой хрена («Sigma»).

Набор для серодиагностики ВЭЛ КРС. Сыворотки крови КРС также были исследованы методом ИФА на наличие антител к вирусу ЭЛ с использованием коммерческого набора «Bovine Ephemeral Fever ELISA kits» (Elizabeth Macarthur Agricultural Institute, Австралия), в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Непрямой вариант иммуноферментного анализа (нИФА.) [1, 3]. Иммобилизацию антигена в лунках 96-луночных полистироловых планшетов (Nunc, Immunoplate, Дания) проводили в объеме 100 мкл на лунку в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе (pH 9,6). После этого вносили положительные и отрицательные контрольные сыворотки КРС по 100 мкл в лунку в разведениях, приготовленных на трис-NaCl буферном растворе с добавлением 0,1% Twin-20 (ТБР-Т, pH 7,4) и инкубировали при 37 С. Образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляли при внесении антивидового бычьего коньюгата в рабочем разведении 1:5000, которое готовили на ТБР-Т с добавлением 10% нормальной сыворотки крови лошади. Планшеты инкубировали при 37 С. Между этапами реакции несвязавшиеся компоненты удаляли путем промывания лунок планшета 3-4 раза промывочным буферным раствором. Индикацию реакции проводили с помощью субстрата ОФД в 0,05 М фосфатно-цитратном буферном растворе (pH 5,0) с добавлением 0,02% перекиси водорода. Планшеты инкубировали при комнатной температуре 5-7 мин. Реакцию останавливали добавлением в лунки планшетов по 50 мкл 10%-й серной кислоты. Показания оптической плотности (ОП) содержимого каждой лунки измеряли с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом при длине волны 492 нм.

Результаты и обсуждения

Для разработки оптимальных условий постановки реакции было проведено определение условий адсорбции антигена на планшет, а также оптимальных временных интервалов взаимодействия реагирующих компонентов реакции в трех повторностях.

С целью оптимизации условий иммобилизации антигенов исследовали влияние времени экспозиции на сорбцию антигена в лунках планшета. С этой целью испытывали режимы иммобилизации в течение 3, 6, 9, 16 часов при температуре 4°С. Процесс адсорбции антигена оценивали по интенсивности окраски реакции с контрольными вирусспецифическими и негативными сыворотками в серийных разведениях. Распределения полученных значений оптической плотности соответственно испытанным разведениям сывороток и заданным условия представлены на рис. 1.

Полученные результаты показали, что способность антигена взаимодействовать с антителами в различных концентрациях зависит от времени его иммобилизации на планшеты. При этом сенсибилизация в течение 3, 6, 9 часов недостаточна для полной сорбции антигена, о чем свидетельствуют

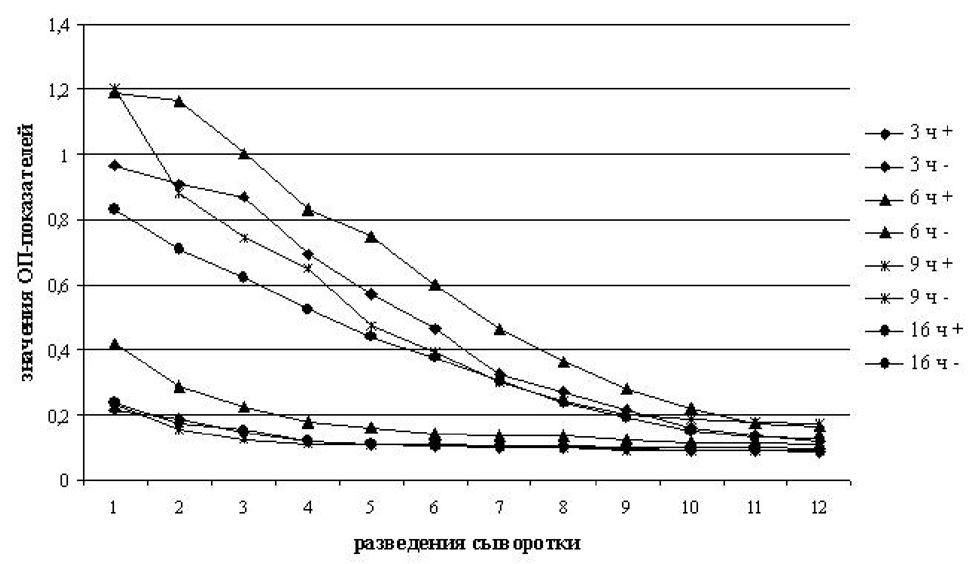


Рис. 1. Распределение средних ОП-показателей специфической контрольной и отрицательной сывороток в зависимости от времени иммобилизации антигена на планшет

+ – значения положительной сыворотки крови (ОП от 0,8 до 1,2);

- – значения отрицательной сыворотки (ОП от 0,2 до 0,4).

значения оптической плотности соответственно испытанным разведениям сывороток. Целесообразнее в этом случае использовать режим иммобилизации антигена в течение 16 часов при температуре 4°С.

Процесс образования стабильных иммунных комплексов в тест-системе ИФА является сложным и требует определенного времени. Поэтому в дальнейшем оценивали интенсивность реакции по распределению полученных значений оптической плотности соответственно испытанным разведениям специфических и отрицательных сывороток, а также коньюгата, в зависимости от времени инкубирования их (от 10 до 120 мин) при температуре 37°С. Полученные данные представлены на рис.2 и 3.

Исследованиями установлено, что значения ОП в обоих случаях в диапазоне от 10 до 60 мин возрастали, а далее стабилизировались. На основании полученных данных 60-минутную экспозицию как сывороток так и конъюгата считали достаточной для достижения стабильной реакции.

Проведенные исследования показали, что наилучшие результаты для адсорбции антигена на плашке при температуре 4°С были в течение 16 часов, а для сыворотки и конъюгата при 37°С в течение 1 часа.

На основании полученных данных титром сыворотки считали ее максимальное разведение, где величина оптической плотности в 2 раза превосходила оптическую плотность контрольной отрицательной сыворотки. Положительными считались пробы сывороток крови с титром 1:10 и выше.

Учитывая вышеизложенное, в дальнейшем было проведено изучение специфической активности сывороток крови, полученных после экспериментального заражения крупного рогатого скота вирусом эфемерной лихорадки. Уровень антител определяли в РДСК, непрямом варианте ИФА и с использованием коммерческого набора (Австралия). Результаты исследований представлены в таблице.

Установлено, что РДСК и нИФА в сыворотках крови всех животных до заражения антител не выявлено, а процент ингибирования (PI) с использованием коммерческого набора ИФА был в пределах 20 (отрицательный результат). С увеличением срока после заражения животных увеличивалась активность сыворотки крови.

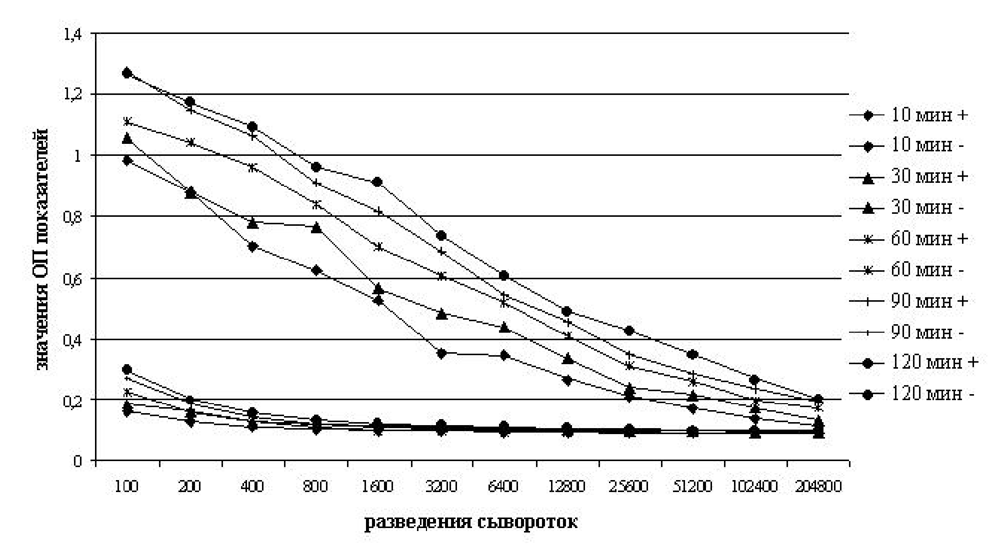


Рис. 2. Распределение средних ОП-показателей специфической контрольной и отрицательной сывороток в зависимости от времени их экспозиции

+ – значения положительной сыворотки крови (ОП от 0,9 до 1,3);

- – значения отрицательной сыворотки (ОП от 0,1 до 0,3).

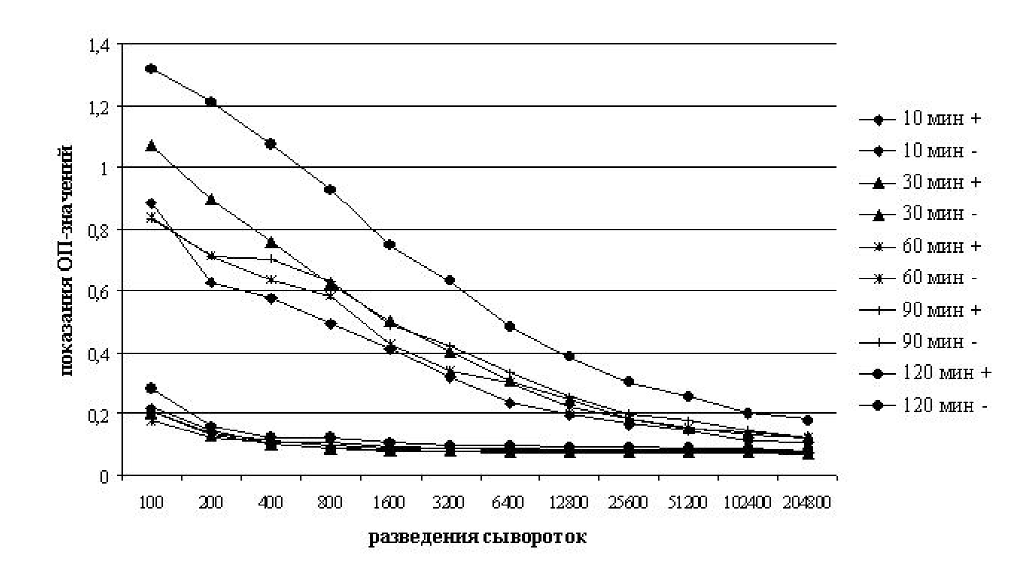


Рис. 3. Распределение средних ОП-показателей специфической контрольной и отрицательной сывороток в зависимости от времени экспозиции конъюгата

+ – значения положительной сыворотки крови (ОП от 0,8 до 1,3);

- – значения отрицательной сыворотки (ОП от 0,1 до 0,3).

Таблица

Результаты исследований специфической активности сывороток крови КРС

№№ животных	Дни отбора проб крови	РДСК		нИФА		коммерческий набор	
		титр	результат	титр	результат	ингибирование	результат
	0	н/а	отр.	н/а	отр.	20%	отр.
	7	1:30	пол.	1:40	пол.	47%	пол.
	14	1:40	пол.	1:160	пол.	57%	пол.
1	21	1:40	пол.	1:160	пол.	56%	пол.
	28	н/и	н/и	1:1280	пол.	77%	пол.
	35	1:80	пол.	>1:2560	пол.	81%	пол.
	42	1:80	пол.	>1:2560	пол.	83%	пол.
	0	н/а	отр.	н/а	отр.	20%	отр.
	7	1:20	пол.	1:160	пол.	50%	пол.
	14	1:30	пол.	1:320	пол.	70%	пол.
2	21	1:30	пол.	1:640	пол.	71%	пол.
	28	н/и	н/и	1:1280	пол.	79%	пол.
	35	н/и	н/и	1:2560	пол.	80%	пол.
	42	1:60	пол.	>1:2560	пол.	84%	пол.
	0	н/а	отр.	н/а	отр.	18%	отр.
	7	1:10	отр.	н/а	отр.	20%	отр.
	14	1:10	отр.	н/а	отр.	25%	отр.
3	21	1:10	отр.	н/а	отр.	40%	сомнит.
	28	н/и	н/и	1:80	пол.	73%	пол.
	35	1:30	пол.	>1:80	пол.	78%	пол.
	42	1:30	пол.	1:160	пол.	72%	пол.

н/а – неактивна;

н/и – не исследовалась.

Так, в РДСК в течение 42 дней после заражения титр антител увеличивался от 1:10 - 1:30 до 1:30 - 1:80, в ИФА - от отрицательного до >1:2560, PI - от 20 до 84. Наличие различной активности сыворотки крови объясняется индивидуальными особенностями животных или тяжестью переболевания эфемерной лихорадкой.

В одном случае при наличии низкой активности сыворотки крови, полученной на 28 день после заражения третьего животного, соответствовавшей в РДСК 1:10 и отрицательной активностью в нИФА, PI составил 40%, что свидетельствовало о «сомнительном» результате.

Для достоверности полученных данных была проведена оценка специфичности результатов реакций с использованием разработанного метода и гетерологичных иммунных сывороток крови КРС против бешенства, ящура и чумы КРС. Установлено, что активность антигена вируса ЭЛ с гетерологичными сыворотками крови не превышала фоновый уровень (реакция с нормальной сывороткой крови КРС).

Исследование сывороток крови крупного рогатого скота с различным уровнем антител к вирусу эфемерной лихорадки в двух тест-системах ИФА позволило рассчитать чувствительность и специфичность разработанного непрямого варианта ИФА в сравнении с коммерческим набором.

Относительную чувствительность метода определяли по формуле A/Bx100%, где А – количество положительных проб при тестировании в разработанном варианте ИФА, совпадающее с количеством положительных проб в коммерческом наборе, В – количество положительных проб в коммерческом наборе.

Относительную специфичность рассчитывали по формуле C/Dx100%, где C – количество отрицательных результатов в разработанном варианте ИФА, совпадающее с количеством отрицательных проб в коммерческом наборе, D – количество отрицательных проб в коммерческом наборе.

Относительная специфичность и чув-

ствительность разработанного метода относительно коммерческой тест – системы составила 100%.

Заключение

Разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа для обнаружения антител к вирусу эфемерной лихорадки крупного рогатого скота.

Сравнительный анализ результатов исследований сывороток крови КРС с использованием указанного метода и коммерческого набора для постановки блокирующего варианта ИФА (Австралия) показал высокую специфичность и чувствительность нИФА, что свидетельствует о возможности его использования для серологической диагностики и мониторинговых исследований эфемерной лихорадки КРС.

Резюме: Разработан простой и чувствительный вариант иммуноферментного анализа для обнаружения антител к вирусу эфемерной лихорадки крупного рогатого скота. Представлены результаты сравнительного исследования сывороток крови крупного рогатого скота с помощью разработанного варианта иммуноферментного анализа и коммерческого набора «Bovine Ephemeral Fever ELISA kits» (Elizabeth Macarthur Agricultural Institute, Австралия), свидетельствующие о возможности использования ИФА для выявления антител против ЭЛ КРС в крови переболевших животных.

SUMMARY

A simple and sensitive immunosorbent assay for detection of antibody against bovine ephemeral fever virus has been developed. Results of comparative testing of bovine sera using the developed immunosorbent assay and a commercial kit «Bovine Ephemeral Fever ELISA kits» (Elizabeth Macarthur Agricultural Institute, Australia), demonstrating a possibility for ELISA application for detection of antibody against bovine ephemeral fever virus in blood from recovered animals, are shown in the paper.

Keywords: bovine ephemeral fever virus, immunosorbent assay

Литература

1. Егоров А.М., Олепов А.П., Гаврилева Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.:Высш. шк., 1991. – 288 с.

2. Константинова Е.А. Получение антигена для обнаружения антител к вирусу эфемерной лихорадки крупного рогатого скота методом ИФА // Ветеринария и кормление.- 2011. - №6. - С. 27-29.

3. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц с использованием серологических реакций. Ч.2. / под ред. Е.А. Непоклонова, Н.А.Власова,В.В. Дрыгина. – Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ», 2008. – 156 с.

4. Получение специфической сыворотки крови животных для диагностики эфемерной лихорадки крупного рогатого скота / Е.А. Константинова [и др.] // Ветеринарная патология. - 2011.- №3(37). - С.91-94.

5. Экспериментальные исследования по изучению клиники эфемерной лихорадки крупного рогатого скота и получению диагностических препаратов / В.И. Диев [и др.] // Вирусные и микробные болезни животных: сб. науч. тр. – Владимир, 1995. – С. 128-131.

6. Эфемерная лихорадка крупного рогатого скота / под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина // Инфекционная патология животных. – М., 2006. – Т.1. – С. 320-324.

7. Nandi S., Negi B.S. Bovine ephemeral fever: a review // Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. – 1999. – Vol. 22. – P. 81-91.

8. Walker P. J. Bovine ephemeral fever virus // Encyclopedia of Virology. – 3rd ed. – N. Y., 2008. – P. 354-362.

Контактная информации об авторах для переписки

Константинова Екатерина Анатольевна, ведущий биолог отдела биологического и технологического контроля ФГБУ «ВНИИЗЖ», аспирантка, e-mail: katochek78@mail.ru +7-919-013-20-88

Диев Вячеслав Иванович, доктор ветеринарных наук, профессор